

# Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie

8. Jahrgang

Mai 1970

Heft 3 (S. 177—320)

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.

8. Jg., S. 177—185, Mai 1970

## Neuere Aspekte der Kininforschung

Von ROSMARIE VOGEL, E. WERLE und GERTRUD ZICKGRAF-RÜDEL

### I. Potenzierung und Blockierung der biologischen Kininwirkung

Von ROSMARIE VOGEL und GERTRUD ZICKGRAF-RÜDEL

*Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München*

*(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle)*

#### Teil 1: Potenzierung

(Eingegangen am 19. Februar 1970)

In experimenteller wie klinisch-therapeutischer Sicht ist die Suche nach Substanzen, welche die biologische Wirkung der Plasmakinine beeinflussen, von großem Interesse. Das erste Übersichtsreferat der Reihe behandelt die potenzierende bzw. sensibilisierende Wirkung von proteolytischen Enzymen, tryptischen Peptiden, Fibrinopeptiden, Bradykinin-potenzierendem Faktor aus Schlangengift, von Antifibrinolytika und von Histaminsynergisten.

Der Wirkungsmechanismus dieser Substanzen wird diskutiert. Enzyme wirken offenbar über eine enzymatische Veränderung der Kininrezeptoren. Messungen der Kininogenkonzentration in Plasma mit Hilfe von Trypsin können durch neben dem Bradykinin gebildete Peptide verfälscht werden. Die bisher vorliegenden Untersuchungen sind auch von Bedeutung für die Frage nach einer Beteiligung der Kinine an physiologischen und pathologischen Vorgängen.

#### *Recent aspects of kinin research. Potentiation and blocking of biological kinin activity*

The search for substances that influence the biological activity of the plasma kinins is of great experimental and clinical-therapeutic interest. The first review of this series deals with the potentiating or sensitising action of proteolytic enzymes, tryptic peptides, fibrinopeptides, bradykinin-potentiating factor from snake venom, antifibrinolytics and histamine synergists.

The mechanism of action of these substances is discussed. Enzymes appear to act by the enzymic alteration of the kinin receptors. Measurements of the plasma kininogen concentration with the aid of trypsin can be invalidated by peptides that are formed with the bradykinin. The investigations reported in this field are also relevant to the question of the involvement of kinins in physiological and pathological processes.

Plasmakinine sind 33 Jahre nach ihrer Entdeckung zusammen mit den sie freilegenden und hemmenden Mechanismen zu einem großen Arbeitsgebiet angewachsen. Kinine besitzen schon in niedrigster Konzentration ein weites Spektrum biologischer Wirkungen (Tab. 1).

Daß dieses Forschungsgebiet von sehr vielen Arbeitsgruppen chemischer, pharmakologischer und medizinischer Richtung so intensiv bearbeitet wird, liegt in der Bedeutung, die den Kininen für physiologische und pathologische Vorgänge im Organismus zugeschrieben wird. Eine klare Abgrenzung der Kininwirkung gegen die Wirkung anderer biologisch aktiver Substanzen steht in vielen Fällen noch aus (Übersicht s. (1)), fordert aber geradezu den Einsatz von spezifischen, blockierenden und potenzierenden Substanzen in experimenteller wie klinisch-therapeutischer Sicht (Teil 2: Blockierung, diese Z. in Vorbereitung).

Eine Verstärkung der Wirkungen von Plasmakininen an verschiedenen Testobjekten kann erzielt werden

durch eine Hemmung des Kininabbaus und durch Einwirkung potenzierender Substanzen am Ort der Kininwirkung. Hier sei nur die zweite Gruppe behandelt (Übersicht über Kininasehemmung s. (2)).

#### *Proteolytische Enzyme*

1964 wurde von EDERY (3) zuerst auf die Potenzierung der Bradykininwirkung am isolierten Meerschweinchenileum durch proteolytische Enzyme hingewiesen. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen der Arbeitsgruppe um EDERY zeigte sich eine hohe Spezifität der Potenzierung von Plasmakininen an diesem Testorgan durch Chymotrypsin. EDERY (4) unterscheidet zwischen Potenzierung und Sensibilisierung. Potenzierung tritt ein, wenn die potenzierende und die biologisch aktive Substanz gleichzeitig am Testobjekt wirksam werden, Sensibilisierung, wenn nach dem Auswaschen der wirksamen Substanz (aus Organ und Organbad) die Wirkung der nachfolgend applizierten biologisch aktiven Sub-

Tab. 1  
Dosierung von Bradykinin bei in vitro- und in vivo-Versuchen

		Wirkung	Schwellendosis	Testdosierung
in vitro	Ileum Meerschweinchen	Kontraktion	1 ng/ml	20—100 ng/ml
	Uterus Ratte	Kontraktion	0,1—0,2 ng/ml	5 ng/ml
	perf. Lunge Meerschweinchen	Kontraktion		0,01—0,05 µg
	A. pulmonalis	Dilatation	1—5 ng/ml	1—20 µg/ml
in vivo	venöse und arterielle Gefäße			2 ng/ml
	Bronchialmuskulatur Meerschweinchen	Konstriktion	0,5—1,0 µg/kg	1—2 µg/kg
	Bronchialmuskulatur Mensch (Asthma)	Konstriktion	24 µg/kg	0,5 % Aerosol
	Kapillarpermeabilität Meerschweinchen	Steigerung	0,1 ng/0,1 ml	0,5 ng/0,1 ml
	Kapillarpermeabilität Ratte	Steigerung	0,1 ng/0,1 ml	0,01—1 mg/0,1 ml
	Visceraler Schmerz		0,1—1,0 µg	0,1—50 µg
	Zentraler Schmerz		1—2 µg	20—50 µg
	Blutdruck	Senkung	0,2—0,5 µg/kg	0,1—10 µg/kg

Tab. 2  
Verstärkung der Kininwirkung durch proteolytische Enzyme an verschiedenen isolierten Testorganen

Enzym	Ileum Meerschweinchen			Uterus Ratte			Ileum Ratte			Fundus Ratte			Ileum Maus			Fundus Maus			Vas deferens Ratte			Literatur
	µg	P	S	µg	P	S	µg	P	S	µg	P	S	µg	P	S	µg	P	S	µg	P	S	
Chymotrypsin (EC 3.4.4.5)	100—500	+	+	300	+	+	500	+	+	400—600	+	+	400	+	+	500	+	+	100—400	+		4—8, 10
Chymotrypsinogen	100—500	+	+	100 bis 500	+	+																3, 5
Trypsin (EC 3.4.4.4)	100—500	+		20 bis 50	+		500	+	+										100—300	+		3—6, 8, 10
Collagenase (EC 3.4.4.19)	500	+	—	500	+	+																4, 7
Plasmin (EC 3.4.4.14)		—																				5, 6
Thrombin (EC 3.4.4.13)		+			+																	5, 6
Pronase	300—500	—	+	300	—	+							200	—	+							4, 7
Ficin (EC 3.4.4.12)	500	+	+																			4
Bromelain (EC 3.4.4.24)	500		+																			8
Papain (EC 3.4.4.10)	500		+																			6, 8
Subtilisin (EC 3.4.4.16)			+																			6

P = Potenzierung  
S = Sensibilisierung, ein +: keine getrennten Angaben vorhanden  
Mengenangaben: µg Enzym/5 ml Organbad

stanz verstärkt wird. Diese Unterscheidung wird jedoch nicht immer und vor allem von anderen Autoren nicht streng durchgeführt.

Tabelle 2 gibt zunächst einen Überblick über die bisher verwendeten Enzyme.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ergeben sich keine einheitlichen Befunde mit Plasmin und Thrombin (5, 6). Die Wirkung von Bradykinin am Meerschweinchen-ileum wird darüber hinaus nicht verstärkt durch Carboxypeptidase, Proteose-Pepton, verschiedene Lipasen (5) und Ribonuclease (4). Chymotrypsin zeigte weder eine potenzierende noch eine sensibilisierende Wirkung am Duodenum von Ratte, Kaninchen und Maus, am Rattencolon, der Rattenharnblase, Trachea vom Hund und am Kaninchenjejunum (4, 7).

In vivo wurde der Einfluß von Chymotrypsin auf die durch Bradykinin hervorgerufene Bronchokonstriktion (4, 5) und Erhöhung der Gefäßpermeabilität (4) beim Meerschweinchen untersucht. I. v. Injektion von 2—8 mg Chymotrypsin/kg steigert die bronchokonstriktio-

rische Wirkung einer nachfolgenden Bradykinin-Injektion erheblich. Dieser Effekt war jedoch nicht immer reproduzierbar. Nach wiederholten Chymotrypsin-Injektionen kam es manchmal zu einer biphasischen Reaktion auf Bradykinin, wobei eine Bronchodilatation der Bronchokonstriktion vorausging. Dagegen kam es nach intracutaner Injektion von Chymotrypsin in die Bauchhaut nicht zur Verstärkung der gefäßpermeabilitäts-erhöhenden Wirkung von Bradykinin. Chymotrypsin (5 µg i. c.) selbst bewirkt eine deutliche Steigerung der Gefäßpermeabilität am Ort der Injektion.

Auf Grund der Tatsache, daß Chymotrypsinogen die Bradykininwirkung zu verstärken vermag (3, 5), wurden Enzyme in nichtaktiver Form in die Untersuchung einbezogen. Hitzedenaturiertes Chymotrypsin, Trypsin, Papain und Bromelain (3, 5, 8), Di-isopropyl-fluor-phosphat-inaktiviertes Chymotrypsin (5, 9) und Di-isopropyl-fluor-phosphat-inaktivierte Pronase (4) zeigten keine potenzierende Wirkung. Dagegen konnten Iso und Mitarbeiter (8) noch eine Sensibilisierung des

Meerschweinchenileums für Bradykinin durch Bromelain und Papain nach Blockierung des aktiven Zentrums durch *p*-Chlormercuribenzoat feststellen.

Um ferner zu klären, inwieweit die Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums von Chymotrypsin an der potenzierenden Wirkung beteiligt ist, wurden das synthetische Peptid Gly-Asp-Ser-Gly (I), das der Sequenz des aktiven Zentrums von Chymotrypsin entspricht, und das Hydrochlorid des Peptids H-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-OCH<sub>3</sub> (II) von EDERY und Mitarbeitern (4, 7) geprüft. Peptid I zeigte in einer Konzentration von 500 µg/5 ml keine verstärkende Wirkung für Bradykinin am Meerschweinchenileum und Rattenuterus. Auch wird Bradykinin von diesem Peptid nicht abgebaut. Dagegen wirkt Peptid II in derselben Dosierung Bradykinin-potenzierend am Meerschweinchenileum und Rattenuterus, jedoch nicht sensibilisierend.

Die Tabellen 3 und 4 zeigen, daß die Sensibilisierung glattmuskulärer Organe durch proteolytische Enzyme nahezu ausschließlich auf die Wirkung von Plasminen beschränkt ist.

Den in der Tabelle 3 wiedergegebenen, hauptsächlich Arbeiten von EDERY entnommenen Befunden stehen einige von HAUSTEIN und MARKWARDT (6) entgegen, nach denen Chymotrypsin, Trypsin und Thrombin neben der Bradykinin- auch die Histaminwirkung am Meerschweinchenileum verstärken, am Rattenuterus neben der Bradykininwirkung auch die von Serotonin.

Nach EDERY (Tab. 4) erstrecken sich Sensibilisierung und Potenzierung durch Chymotrypsin auf die bekannten, natürlich vorkommenden Plasmakinine und auch auf verschiedene Bradykinin-Analoga. Die verwendeten Analoga zeigen alle eine eigene relativ hohe biologische Aktivität. Erstaunlich ist, daß keine Sensibilisierung für Substanz 7 erfolgt, die selbst hohe Bradykinin-Aktivität am Meerschweinchenileum besitzt. Substitution in Position 6 (Substanz 8) sowie N-terminale Verlängerung des Bradykininmoleküls (Substanz 2) je allein beeinflussen dagegen die Sensibilisierung durch Chymotrypsin nicht.

Die dargestellten Befunde zeigen deutlich den spezifischen Einfluß von Chymotrypsin auf die Wirkung von

Tab. 3

Vergleich der Potenzierung biologisch aktiver Substanzen an verschiedenen isolierten glattmuskulären Organen durch proteolytische Enzyme

Enzym	Testorgan	Bradykinin	Slow reacting substance	Substanz P	Eleidoisin	Angiotensin	Oxytocin	Vasopressin	Histamin	Acetylcholin	5-Hydroxytryptamin	ATP, anorganische Substanzen
Chymotrypsin (3—5, 8, 9)	Ileum Meerschweinchen	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Uterus Ratte	+			+		+	—	—	—	—	
	Fundus Ratte	+				—				—	—	
	Ileum Ratte	+				—				—		
	Fundus Maus	+				—						
	Ileum Maus	+				—						
	Ileum Meerschweinchen	+							—	—		
	Trypsin (3, 4, 8)	+							—	—		
	Collagenase (4)	+								—		
	Pronase (4)	+								—		
Ficin (4)	Ileum Meerschweinchen	+			—	—				—	—	
	Bromelain Papain (8)	+							—	—		
Subtilisin (6)	Ileum Meerschweinchen	+							+			
	Uterus Ratte										+	
	Plasmin (6)	+							+			
Plasmin (6)	Ileum Meerschweinchen										+	
	Uterus Ratte											

Tab. 4

Verstärkung der biologischen Wirkung von Bradykininanaloga am isolierten Meerschweinchenileum durch proteolytische Enzyme

Substanz	Aminosäuresequenz									Chymo- trypsin	Chymotryp- sinogen	Trypsin	Litere- atur	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9					
Bradykinin	H—Arg—Pro—Pro—Gly—Phe—Ser—Pro—Phe—Arg—OH													
1		Lys—								100—500	+	200 +	200 +	5, 9
2		Met—Lys—								100—500	+			5, 9
3		Gly—Lys—									+			4, 7
4		Phe—Lys—									+			4, 7
5	Ser—Lys—	Met—Lys—									+			4, 7
6		Lys—Lys—									+			4, 7
7		Met—Lys—					Gly				—			4, 7
8							Gly			100—500	+			9
9								Gly		100—500	+			9

Mengenangaben: µg Enzym/5 ml Organbad

Tab. 5  
Eigenwirkung von Enzymen an isolierten Testorganen

Enzym	Ileum, Meerschweinchen Reaktion	Hemmung durch	Tachy- phylaxie	Uterus, Ratte Reaktion	Tachy- phylaxie	Vas deferens, Ratte Reaktion	Hemmung durch
Chymotrypsin (3, 6, 10)	Tonusanstieg 10 $\mu$ g Kontraktion 20—100 $\mu$ g	Mepyramin*	+	— 10—50 $\mu$ g	—	Kontraktion 100 $\mu$ g	Mepyramin*
Trypsin (3, 6, 10)	Kontraktion 0,5—1,5 $\mu$ g 20—100 $\mu$ g	Diphenhydramin*	+	Kontraktion 0,2—10 $\mu$ g	+	Tonusvermin- derung und Kontraktion 100—500 $\mu$ g	—
Thrombin (6)	Kontraktion 0,5—1,5 $\mu$ g	Diphenhydramin*	+	Kontraktion 0,05 $\mu$ g	+	—	—
Plasmin, Papain, Subtilisin (6)	Tonusanstieg 10 $\mu$ g	—	—	— 10 $\mu$ g	—	—	—
Chymotrypsinogen (3)	20—100 $\mu$ g	—	—	20—100 $\mu$ g	—	—	—
H—Gly—Asp— Ser—Gly—Gly—Pro— Leu—Val—OCH <sub>3</sub> —Hydrochlorid (4)	Kontraktion und Erschlaffung 100 $\mu$ g	—	—	—	—	—	—

Die Mengenangaben beziehen sich auf je 1 ml Badflüssigkeit

\*) Nomenklatur nach K. IPPEN, Index Pharmacorum, Stuttgart 1968

Plasmakinen. Dabei ist  $\delta$ -Chymotrypsin wirksamer als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Chymotrypsin (13).

Die Wirkung proteolytischer Enzyme an isolierten Organen ist abhängig von Dosierung und Kontaktzeit. Der höchste Grad der Sensibilisierung wird durch mehrmalige Zugabe von Chymotrypsin zum Organbad erzielt, wobei die Kontaktzeit jeweils 1 Min. beträgt (3, 9). Jedoch genügt eine Kontaktzeit von 5 Sek., um einen Sensibilisierungseffekt hervorzurufen (5). Nach ISO und Mitarbeitern (8) wird die Wirkung von Bradykinin am isolierten Meerschweinchenileum durch Chymotrypsin, Trypsin, Bromelain und Papain zunächst potenziert, bei Steigerung der Enzymkonzentration verringert. Verlängerung der Kontaktzeit hat einen Umschlag der potenzierenden in eine hemmende Wirkung schon bei niedriger Dosierung zur Folge. Nach GRAHAM und AL KATIB tritt der hemmende Effekt am isolierten Vas deferens des Meerschweinchens z. B. bei einer Kontaktzeit von 10 Min. und einer Konzentration von 500  $\mu$ g Trypsin/ml ein (10). Die Hemmung ist unspezifisch und betrifft andere biologisch aktive Substanzen schon in niedrigerer Dosierung (8, 10).

Chymotrypsin verändert den Verlauf der Kontraktionskurven von Bradykinin und Kallidin am Meerschweinchenileum in charakteristischer Weise (9): nach mehrmaliger Enzymapplikation kommt es zu einer allmählichen Verkürzung der Latenzzeit und zu einem gleichzeitigen Anstieg der Höhe der Kontraktionen. Die Form der Kontraktionskurve wird der durch Histamin hervorgerufenen ähnlich. Am Rattenileum erzeugt Bradykinin eine Erschlaffung mit nachfolgender Kontraktion. Hier verstärkt Chymotrypsin die Phase der Kontraktion (4).

Nach vorangegangener Sensibilisierung des Testorgans wird es möglich, unterschwellige Kininmengen nachzuweisen. Nach 3—5maliger Anwendung von 100 bis 300  $\mu$ g Chymotrypsin/5 ml erzeugt 1 ng Bradykinin/5 ml eine Kontraktion des Meerschweinchenileums (3). Ebenso werden 2 ng Kallidin/5 ml nach 3mal 500  $\mu$ g Chymotrypsin nachweisbar (9). Am Rattenuterus ist nach 4—5maliger Zugabe von 150  $\mu$ g Chymotrypsin

Tab. 6  
Wirkungen proteolytischer Enzyme auf das Kallikrein-Kinin-System\*

Enzym	Kinin- freisetzung aus Kininogen	Aktivierung von Präkalli- krein	Kinin- abbau	Kininase- hemmung
Trypsin Chymotrypsin	+	+	+	+
	(aus Meer- schweinchen- plasma) (13)			(Meerschwein- chenileum isoliert und Homogenat) (4)
Plasmin	?	?	+	
Papain	+	+	+	
Bromelain (13a)	+	+	+	
Pronase (4)	+	+	+	

\* Lit. Übersicht bei I. c. (1)

zum Organbad 0,1 ng Bradykinin/5 ml wirksam (3). Die Werte entsprechen etwa einer 5fachen Verstärkung der Kininwirkung (s. Tab. 1).

Die spezifisch für Kinine sensibilisierende Wirkung von Chymotrypsin ermöglicht es z. B. in einem Gemisch biologisch aktiver Substanzen Kinine nachzuweisen (9). Ferner ist eine Abgrenzung von Kininen gegen andere biologisch aktive Peptide möglich (11). Orientierende Versuche ergaben, daß z. B. die Wirkung präformierter Insektenkinine durch Chymotrypsin nicht potenziert wird (5, 9). Einen weiteren Vorteil bringt die Sensibilisierung isolierter Testorgane für den quantitativen Nachweis sehr geringer Kininmengen (12, 13). Die große Zahl der Befunde führte bisher nicht zu einer Aufklärung des Wirkungsmechanismus. Einige der wirksamen Enzyme zeigen an den isolierten Testorganen eine Eigenwirkung. Diese ist jedoch im allgemeinen hemmbar durch Antihistaminica und/oder nur wenige Male auslösbar (Tab. 5), kommt also für eine Erklärung vor allem der Sensibilisierung nicht in Frage. Ferner sind die Wirkungen der sensibilisierenden Enzyme auf die Komponenten des Kininogenase-Kinin-Systems auszuschließen (Tab. 6). Kininfreisetzung oder Aktivierung von Präkallikrein ist am isolierten Testorgan, vor allem nach dem Auswaschen des Enzyms, nicht wahrscheinlich. Die kininabbauende Wirkung von Chymotrypsin steht mit der potenzierenden Wirkung in Widerspruch. Für die fehlende Potenzierung durch Pronase wird jedoch von EDERY und GRUNFELD (4) der Kininabbau

durch dieses Enzym zur Erklärung herangezogen. Ferner schließen die Autoren eine Kininasehemmung durch Chymotrypsin am Meerschweinchenileum aus, da auch nach Chymotrypsineinwirkung Glutathion, das die Kininase des Meerschweinchenileums hemmt, noch potenzierend wirkt (s. Tab. 6).

EDERY und GRUNFELD (4) halten eine Wirkung auf der Ebene der Zellmembranen für wahrscheinlich, etwa im Sinne einer Freilegung zusätzlicher Kininrezeptoren. Stereochemische Veränderungen würden dann nur den Zugang von Molekülen einer bestimmten Form und Größe zu den Rezeptoren gestatten, und somit die Spezifität der Sensibilisierung für Kinine im Gegensatz zu anderen biologisch aktiven Substanzen erklären. Daß manche Testorgane nicht sensibilisiert werden, könnte ein Hinweis auf strukturelle Unterschiede der Bradykininrezeptoren sein. Die Mehrzahl der Befunde weist darauf hin, daß die potenzierende und sensibilisierende Wirkung an die enzymatische Aktivität des intakten Moleküls gebunden ist. Ob die Sensibilisierung durch Chymotrypsinogen einem anderen Wirkungsmechanismus folgt, kann noch nicht entschieden werden. Der hemmenden Wirkung hoher Enzymdosen liegt wahrscheinlich ein anderer Wirkungsmechanismus zugrunde, da sie sich nicht spezifisch auf Plasmakinine erstreckt (8, 10).

#### *Tryptische Peptide*

Zur Erklärung einer etwaigen Bradykinin-potenzierenden Wirkung von Trypsin in vivo könnten Arbeiten von AARSEN (14) und HAMBERG und Mitarbeitern (15) beitragen. Nach AARSEN (14) ergibt das bei der Aufarbeitung von Rinder- und Kaninchenplasma, entsprechend der von DINIZ und CARVALHO (16) angegebenen Methode zur Kininogenbestimmung, erhaltene Trypsinhydrolysat bei der Testung am isolierten Meerschweinchenileum eine wesentlich steilere Linie der Dosis-Wirkungsbeziehung als die von synthetischem Bradykinin. Wird eine bestimmte Menge Hydrolysat, die selbst fast keine Eigenwirkung zeigt, zusammen mit Bradykinin ausgetestet, so ist die kontrahierende Wirkung weit stärker als es einer Addition von Bradykinin und einer eben unterschwelligen Kinindosis im Hydrolysat entsprechen würde. Potenzierende Fraktionen weisen bei einer Auftrennung des Hydrolysates an Amberlite CG-50 einen niedrigen pH-Wert auf als Bradykinin. Bei der Elektrophorese der potenzierenden Fraktionen ergeben sich mehrere Ninhydrin-positive Komponenten, die alle anodisch wandern. Für die Potenzierung von Bradykinin dürften also mehrere Peptide verantwortlich sein. Es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem log Dosis und der Bradykinin-potenzierenden Aktivität der wirksamen Fraktionen.

Potenzierende Aktivität wird auch erhalten bei Inkubation von Rinder-Serumalbumin mit Trypsin, die weit stärker ist als die der verwendeten Trypsinmenge allein. Inkubation von Rinderplasma ohne Trypsin ergibt keine potenzierende Aktivität (14). Die potenzierenden Peptide entstehen also durch Einwirkung von Trypsin

auf Serumproteine. Die Potenzierung ist spezifisch auf Bradykinin gerichtet, wobei es zu einer Verstärkung des mit Bradykinin allein maximal zu erzielenden Effektes kommen kann. Die Wirkungen von Acetylcholin, Histamin, Angiotensin und Eledoisin am Meerschweinchenileum werden nicht verstärkt, die von Serotonin gehemmt (14).

Die Wirkung der potenzierenden tryptischen Peptide könnte nach HAMBERG und Mitarbeitern (15) auf einer Kininasehemmung beruhen.

Nach Trypsin-Hydrolyse von Humanplasma wird von HAMBERG Bradykinin mit Hilfe von Ionenaustauscherchromatographie an IRC-50 (XE-64)-Harz abgetrennt. Die weitere Reinigung der potenzierenden Peptide erfolgt an Sephadex G-10 oder G-25 und Dowex-50-WX-2-Säulen; die Elution der Peptide erfolgt zwischen pH 5 und 8. Die Peptide zeigen keine Eigenwirkung am Meerschweinchenileum, potenzieren jedoch die Wirkung von Bradykinin.

In vitro wird die Spaltung von Hippuryl-L-arginin durch Carboxypeptidase B bei Zusatz der gereinigten Peptide kompetitiv gehemmt, ebenso wie bei Zugabe von synthetischem Bradykinin, von dem C-terminal Arginin abgespalten wird. Nach Einwirkung von Carboxypeptidase B auf die potenzierenden Peptide wird ebenfalls freies Arginin gefunden. Durch Peptide mit C-terminalem Arginin (oder Lysin, entsprechend der Substratspezifität) müßte also ganz allgemein eine kompetitive Substrathemmung der Carboxypeptidase B erfolgen.

Die vorliegenden Untersuchungen gestatten jedoch nicht den Schluß, daß die potenzierende Wirkung tryptischer Peptide in vivo und am isolierten Organ auf eine Kininasehemmung zurückzuführen ist, was einer wirklichen Potenzierung am Ort der Kininwirkung auch nicht entsprechen würde. Von STEWART (17) wurde auf die Bedeutung der freien Carboxylgruppe des Kininmoleküls und die des Arginins in Position 9 für die biologische Aktivität hingewiesen. Jedoch zeigen auch Analoga, bei denen Arg<sup>9</sup> z. B. durch Lysin oder Ornithin (Aminosäuren mit langen, polaren Seitenketten) ersetzt ist, hohe biologische Aktivität. Möglicherweise erfolgt die Anlagerung des Bradykininmoleküls an den Rezeptor vom freien Carboxylende her (18). Ob unter Umständen von den strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Bradykinin und potenzierenden Peptiden in bezug auf den Rezeptor ein Weg zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus führt, ist eine offene Frage.

Die praktische Konsequenz aus den Untersuchungen von AARSEN (14) und HAMBERG (15) ist die Kenntnis einer eventuellen Verfälschung der Ergebnisse von Kininbestimmungen im Plasma durch potenzierende tryptische Peptide.

Wie weit Peptide aus einem im Handel erhältlichen, teileingereinigten Extrakt aus Schweineleber (19), die die Bradykininwirkung am Meerschweinchenileum, sowie die durch Bradykinin hervorgerufene Erhöhung der Kapillarpermeabilität an der Meerschweinchenhaut verstärken, den beschriebenen tryptischen Peptiden entsprechen, kann nicht entschieden werden, da keine vergleichbaren Angaben vorliegen.

Tab. 7

Aminosäuresequenz von Fibrinopeptiden

I Fibrinopeptid A Rind	II Fibrinopeptid B Rind	III Fibrinopeptid A ( $\beta$ ) Mensch	IV Fibrinopeptid B Mensch	V Fibrinopeptid $\beta$ Hund
I	Glu—Asp—Gly—Ser—Asp—Pro—Pro—Ser—Gly—Asp—Phe—Leu—Thr—Glu—Gly—Gly—Gly—Val—Arg			
	SO <sub>4</sub>			
II	N—Acetyl—Thr—Glu—Phe—Pro—Asp—Tyr—Asp—Glu—Gly—Glu—Asp—Asp—Arg—Pro—Lys—Val—Gly—Leu—Gly—Ala—Arg			
III	H—Ala—Asp—Ser—Gly—Glu—Gly—Asp—Phe—Leu—Ala—Glu—Gly—Gly—Gly—Val—Arg—OH			
	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>			
IV	Pyr—Gly—Val—Asp—Asp—Asp—Glu—Gly—Phe—Phe—Ser—Ala—Arg—OH			
	NH <sub>2</sub>			
V	H—Thr—Asp—Ser—Glu—Gly—Lys—Glu—Phe—Ileu—Ala—Gly—Gly—Gly—Val—Arg—OH			

*Fibrinopeptide*

GLADNER und Mitarbeiter (20, 21) beschrieben die Potenzierung der Bradykininwirkung am isolierten Rattenuterus durch Fibrinopeptide verschiedener Spezies. Bei der Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen entstehen neben Fibrin sogenannte Fibrinopeptide oder Co-fibrine. Bei allen bisher untersuchten Spezies werden hauptsächlich zwei saure Peptide A und B freigesetzt, deren Struktur zum großen Teil aufgeklärt ist (22). Die Tabelle 7 zeigt die Struktur von Fibrinopeptiden aus Rinder-, Menschen- und Hundefibrinogen.

Beim Menschen wurden zwei A-Peptide gefunden, die sich lediglich durch Phosphorylierung des Serins in Position 3 unterscheiden. Das Peptid mit dem phosphorylierten Serin wird mit  $\alpha$ , das nicht phosphorylierte mit  $\beta$  bezeichnet. Entsprechende  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptide werden auch aus dem Fibrinogen des Hundes durch Thrombin freigesetzt. Von den in der Tabelle aufgeführten Peptiden zeigen eine Bradykinin-potenzierende und -sensibilisierende Wirkung nur die Peptide II, III und V. Die entsprechenden  $\alpha$ -Peptide sowie I und IV sind wirkungslos (20, 21). Rinderpeptid B potenziert in einer Konzentration von 0,4  $\mu\text{g/ml}$  (oder 0,2 nMol/ml) und bei einer Kontaktzeit von 10 Min. (21); 4  $\mu\text{g/ml}$  potenzieren bei einem minimalen Kontakt von 1 Min. (20). Nach Zusatz potenzierender Peptide zum Organbad können unterschwellige Bradykinindosen Kontraktion auslösen. Außer der Wirkung von Bradykinin wird auch die der Bradykinin-Analoga Gly<sup>6</sup>-, Tyr<sup>5</sup>-, Gly<sup>9</sup>- und Lys<sup>9</sup>-Bradykinin am isolierten Rattenuterus verstärkt. Das  $\beta$ -Peptid vom Menschen zeigt eine stärkere potenzierende Wirkung als Peptid B vom Rind.

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus wurden folgende Modifikationen an den Peptiden vorgenommen (20, 21):

1. Tryptische Spaltung der Lys-Val-Bindung beim Peptid B vom Rind; Hydrolyse durch Chymotrypsin zwischen Phe-Leu bzw. Phe-Ile und Leu-Ala bzw. Ile-Ala beim  $\beta$ -Peptid von Mensch und Hund.
2. Entfernung des C-terminalen Arg durch Carboxypeptidase bei allen potenzierenden Peptiden.
3. Entfernung des Sulfates vom Rinderpeptid B und von der entsprechenden Teilsequenz nach tryptischer Hydrolyse.
4. Peptische und saure Hydrolyse.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt: Die nach Hydrolyse des Peptides B vom Rind erhaltene N-terminale Sequenz mit 15 Aminosäuren behält die potenzierende Aktivität, während die C-terminale, aus 6 Aminosäuren bestehende Teilsequenz unwirksam ist. Die Spaltung des  $\beta$ -Peptides vom Menschen liefert 4 Bruchstücke, von denen die beiden mit C-terminalem Arginin nicht mehr potenzierend wirken. Die N-terminalen Bruchstücke zeigen keinen Verlust der Aktivität. Mit dem  $\beta$ -Peptid aus Hundefibrinogen werden entsprechende Ergebnisse erzielt. Beim Vorgehen nach 2. und 3. wird die potenzierende Aktivität nicht verändert. Das peptische Hydrolysat hat noch eine geringe potenzierende Aktivität, durch Säurehydrolyse geht die gesamte Aktivität verloren.

Es scheinen Zusammenhänge zwischen der potenzierenden Wirkung von Fibrinopeptiden und der tryptischen Peptide zu bestehen. FABER (23, 24) verglich an Sephadex gereinigte menschliche (positiv und negativ geladene) Fibrinopeptide mit tryptischen Peptiden (positiv und negativ geladen) aus Kaninchenplasma. Durch alle Peptide wurde die Bradykininwirkung an verschiedenen isolierten Testorganen (Meerschweinchenileum, Rattenuterus, Vas deferens der Ratte, Kaninchenileum, Meerschweinchenbronchien, Meerschweinchenlungengefäße, Rattenaorta und Coronararterie vom Schaf) verstärkt, nicht aber die von Acetylcholin, Histamin, Serotonin, Noradrenalin, Adrenalin, Ergometrin, Angiotensin, Eledoisin oder Oxytocin. Alle getesteten Peptide haben in hoher Konzentration eine Bradykinin-ähnliche Eigenwirkung am Rattenuterus und Kaninchenileum, nicht aber an den anderen Testorganen.

Nach FABER (24) ist eine Kininasehemmung durch die potenzierenden Peptide auszuschließen. Das ergibt sich unter anderem daraus, daß bei Einwirkung der Peptide die Latenzzeit bis zum Einsetzen der Bradykininwirkung in stärkerem Maße verkürzt ist als es dem Anstieg der Kontraktionshöhe entspräche, wenn dieser durch Steigerung der Bradykinindosis hervorgerufen wäre. Weiter spricht die Erhaltung der potenzierenden Wirkung nach Abspaltung des C-terminalen Arginins von Fibrinopeptiden (20, 21) gegen die bereits erwähnte, von HAMBERG (15) diskutierte Substrathemmung von Kininasen (Carboxypeptidasen). Jedenfalls können Peptide mit sehr verschiedener Struktur potenzierend wirken. Auffallend ist, daß das wirksame menschliche  $\beta$ -Peptid N-terminal die Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums von Chymotrypsin, nämlich Ala-Asp-Ser-Gly aufweist und

daß diese Sequenz sich nach der Hydrolyse des  $\beta$ -Peptides in der wirksamen Teilsequenz befindet. Phosphorylierung des Serins in Position 3 ergibt die nicht potenzierenden  $\alpha$ -Peptide. Dieser Befund entspricht dem Aktivitätsverlust hydrolytischer Enzyme bei Phosphorylierung des Serins im aktiven Zentrum (9, 21, 22). Es ist jedoch sehr fraglich, ob die nicht enzymatisch aktive Sequenz im Fibrinopeptid als solche eine wesentliche Rolle für die Potenzierung spielt. Wie erwähnt, zeigt das von EDERY und Mitarbeitern (4, 7) untersuchte synthetische Peptid I mit der Sequenz des aktiven Zentrums von Chymotrypsin keine potenzierende Wirkung; außerdem weisen die übrigen wirksamen Fibrinopeptide diese Sequenz nicht auf.

#### BPF (Bradykinin-potentiating factor) aus Schlangengift

1965 berichtete FERREIRA (25) über das Vorkommen eines Bradykinin-potenzierenden Faktors (BPF) im Gift von *Bothrops jararaca* und anderer *Bothrops*-Arten. Setzt man den Gehalt von BPF aus *Bothrops jararaca* als 1, so ergeben sich folgende Aktivitätsverhältnisse für BPF in *Bothrops*- und *Crotalus*-Giften: *B. atrox* 0,42, *B. neuwiddii* 0,30, *Crotalus viridi viridi* 1,7, andere *Bothrops*- und *Crotalus*-Arten < 0,10 (26). KATO und SUZUKI (27, 28) beschrieben ferner das Vorkommen potenzierender Aktivität im Gift von *Agkistrodon halys blomhoffii*. Nach Anreicherung des BPF aus *B. jararaca* wurde zunächst angenommen, daß das wirksame Prinzip aus 2 Polypeptiden besteht (26). Der auf das 8—10fache angereicherte BPF wird durch Säurehydrolyse und Trypsin zerstört, dagegen erfolgt keine Inaktivierung durch Chymotrypsin. BPF wandert anodisch und ergibt eine positive Ninhydrin- und SAKAGUCHI-Reaktion (25). Weitere Auftrennung mit Hilfe von Gel-Filtration an Sephadex G-25 und Ionenaustauscherchromatographie ergab sieben einheitliche biologisch aktive Peptide mit verschiedenen starken spezifischen Bradykinin-potenzierenden Aktivitäten (29, 30). Eines der Peptide (PCA-Lys-Try-Ala-

Pro) wurde synthetisiert. Es zeigte am Meerschweinchenileum in einer Konzentration von 0,05  $\mu\text{g/ml}$  potenzierende Aktivität (30).

KATO und SUZUKI (27, 28) isolierten aus Gift von *A. halys blomhoffii* fünf aktive Peptide, wovon jeweils 5—20  $\mu\text{g}$  am Meerschweinchenileum die Wirkung von Bradykinin verdoppelten. Die Aminosäureanalyse ergab 8 bis 10 Aminosäuren je Peptid. Alle fünf Peptide enthalten 1 Mol Glutaminsäure und 4 Mole Prolin, jedoch nur eines der Peptide 1 Mol Tryptophan.

Die potenzierende Aktivität des BPF ist wie die der bereits beschriebenen Peptide spezifisch auf Plasmakinine gerichtet (Tab. 8). An isolierten Testorganen zeigt BPF keine Eigenwirkung, bei in vivo Versuchen dagegen bei rascher Injektion bzw. Verabreichung der mehrfachen potenzierenden Dosis (Kapillarpermeabilität) geringe Bradykinin-ähnliche Wirkung (25, 26). Bei den in Tabelle 8 angegebenen in vitro Untersuchungen handelt es sich jeweils um Potenzierung, nicht um Sensibilisierung. Dabei reagiert das Meerschweinchenileum empfindlicher auf BPF als der Rattenuterus.

Nach i. v. Injektion von BPF wird bei Hunden und Katzen eine 30 Min. anhaltende, jedoch mit der Zeit abnehmende, erhöhte Ansprechbarkeit auf nachfolgende Bradykinin-Injektionen beobachtet. Dabei ist der Wiederanstieg des Blutdrucks wesentlich verzögert, d. h. die Rückkehr zum Ausgangswert erfolgt später als nach einer vergleichbaren Senkung, die durch Bradykinin allein hervorgerufen wurde (25, 31). Wird Bradykinin (1  $\mu\text{g/kg/Min.}$ ) zusammen mit BPF einem Hund über 15 Min. infundiert, so ist 60 Min. nach Beendigung der Infusion das Ausgangsniveau noch nicht erreicht (26).

Werden wirkungsgleiche Mengen Bradykinin und Eledoisin am Blutdruck von Hund und Katze verglichen, so zeigt BPF beim Hund in bezug auf die Eledoisinwirkung eine stärkere Bradykinin-potenzierende Wirkung als bei der Katze. Nach BPF-Injektion führen

Tab. 8

Potenzierung biologisch aktiver Substanzen an verschiedenen Testobjekten durch Bradykinin-potentiating-factor (BPF) (25, 26, 31, 32)

Testobjekt	Bradykinin	Kallidin	Eledoisin	Angiotensin	Oxytocin	Histamin	Acetylcholin
<b>In vitro</b>							
Ileum	+	+	—	(+)		—	—
Meerschweinchen							
Uterus	+	+	—		(+)	—	—
Ratte							
Duodenum	+	+	—			—	—
Kaninchen							
Bronchokonstriktion und Coronardilatation (Langendorff-Präparat)	+						
Meerschweinchen							
<b>In vivo</b>							
Systemischer Blutdruck							
Katze	+	+	((+))			—	—
Hund	+	+	—			—	—
Venöser Druck intrakranial (Injektion in die A. carotis)	+	+				—	
Hund							
Kapillarpermeabilität	+						
Ratte							
Hämokonzentration	+						
Verhaltens- und EEG-Änderungen (Intraventrikuläre Injektion)	+						
Katze							



unterschwellige Bradykinindosen ( $0,024-0,066 \mu\text{g/kg}$ ) zu deutlicher Blutdrucksenkung (31). Beim Hund bewirkt die Injektion von  $0,01-0,1 \mu\text{g}$  Bradykinin in die *A. carotis* einen Anstieg des intrakranialen venösen Drucks um  $1-6 \text{ cm H}_2\text{O}$ . Der systemische Blutdruck und die Atmung bleiben dabei unbeeinflusst, auch wenn die intrakranielle Bradykininwirkung durch gleichzeitige Injektion von BPF in die *A. carotis* verstärkt wird. Kallidin ist in dieser Versuchsanordnung wirksamer als Bradykinin, wird jedoch weniger stark potenziert (32). Nach FERREIRA und Mitarbeitern (26, 29, 30) beruht der Wirkungsmechanismus von BPF wenigstens teilweise auf einer Hemmung Kinin-abbauender Enzyme. In vitro wird eine Hemmung des Kininabbaus durch hämolysierte Erythrocyten vom Meerschweinchen oder Plasma verschiedener Spezies beobachtet, jedoch nur bis zu einem Grenzwert, der durch Erhöhung der BPF-Konzentration nicht gesteigert werden kann. Dabei tritt kein Aktivitätsverlust von BPF auf; das würde bedeuten, daß BPF nicht im Sinne einer Substrathemmung wirkt (15). In vivo kann die Abnahme der Bradykinin-abbauenden Aktivität durch BPF mit der Intensität der Bradykininwirkung korreliert werden (26). BPF (33) und das oben erwähnte synthetische Pentapeptid (30) vermögen bei i. v. Infusion an der Ratte die pulmonale Inaktivierung von Bradykinin zu unterdrücken (Pentapeptid  $120 \mu\text{g/Min.}$ : Abnahme des Kininabbaus von 98 auf 30%). Auch hier bleibt die Frage, inwieweit die wirksamen Peptide, die in manchen Eigenschaften den Kininen nahestehen, direkt am spezifischen Kininrezeptor ihre Wirkung entfalten.

#### *Antifibrinolytika*

Nach DOLESCHER und AUERSWALD (34, 35) wird die Wirkung von  $10 \text{ ng}$  Bradykinin oder Kallidin/ml durch  $0,01 \text{ M}$   $\epsilon$ -Aminocapronsäure, Acetyl- $\epsilon$ -Aminocapronsäure oder *p*-Aminomethylbenzoesäure am Meerschweinchenileum potenziert, während die Wirkungen von Eledoisin, Angiotensin und Histamin nicht beeinflusst werden. Die als Fibrinolyse-Inhibitoren bekannten Substanzen unterdrücken jedoch in einer  $0,1 \text{ M}$  Konzentration die Wirkungen von Bradykinin, Kallidin, Eledoisin und Angiotensin, in einer Konzentration von  $0,01-0,1 \text{ M}$  auch die Wirkungen von Histamin, Serotonin und Acetylcholin. Während in niedrigen Konzentrationen ein spezifisch auf Kinine gerichteter Effekt vorliegt, ist dieser in höheren Konzentrationen unspezifisch und auf verschiedene Erregungsabläufe gerichtet. Eine Hemmwirkung auf Kininasen schließen die Autoren aus; der Wirkungsmechanismus konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

#### *Histamin-Synergist Betazol<sup>1)</sup>*

Neben histaminartigen Wirkungen führt Betazol<sup>1)</sup> auch zur Potenzierung von Kininen und Serotonin. Nach

Betazol-Applikation werden die Wirkungen von Bradykinin, Kallidin und Serotonin am Blutdruck des Hundes, am Meerschweinchenileum und Rattenuterus gesteigert, am Katzenblutdruck nur die von Serotonin. Nicht beeinflusst werden die Wirkungen von Histamin und Acetylcholin am isolierten Meerschweinchenileum und die von Histamin, Acetylcholin, Noradrenalin und Angiotensin am Blutdruck des Hundes (36).

#### *Lokalanästhetica*

Konzentrationsabhängig entfalten verschiedene Lokalanästhetica sowohl hemmende als auch potenzierende Wirkung (37, 38). Bradykinin führt an der isoliert perfundierten Hinterpfote der Katze zu einer dosisabhängigen Vasokonstriktion. Diese durch  $0,16 \mu\text{g}$  Bradykinin ausgelöste Vasokonstriktion wird durch Zusatz von  $2 \text{ mg}$  Procain<sup>1)</sup>/ml um 100% verstärkt. Die vasokonstriktorischen Wirkungen von Adrenalin und Histamin werden um 30 bzw. 90% vermindert. Das Procain-spaltprodukt Diäthylaminoäthanol verstärkt die Bradykininwirkung in einer Konzentration  $> 10 \text{ mg/ml}$  um 30%, während *p*-Aminobenzoessäure ( $5 \text{ mg/ml}$ ) die Bradykininwirkung vollständig unterdrückt. Kokain ( $1 \text{ mg/ml}$ ) wirkt wie Procain. Jedoch hält die Wirkung (auch nach Übergang auf normale Durchströmungsflüssigkeit) deutlich länger an als nach Procain. Tetracain<sup>1)</sup> ( $1 \text{ mg/ml}$ ) unterdrückt die Bradykininwirkung vollständig, nach Übergang auf Perfusion ohne Lokalanästhetica erfolgt eine Wirkungsverstärkung um 200%. Propipocain<sup>1)</sup> und Lidocain<sup>1)</sup> ( $1 \text{ mg/ml}$ ) hemmen die Bradykininwirkung irreversibel. Die durch Adrenalin ( $0,002 \text{ mg}$ ) erzeugte Vasokonstriktion wird durch Cocain, Procain und Tetracain gehemmt, nach Übergang auf normale Durchströmungsflüssigkeit jedoch gesteigert.

Am isolierten Meerschweinchenileum verstärkt Procain ( $0,5 \text{ mg/ml}$ ) die Bradykininwirkung, während Kokain ( $0,5 \text{ mg/ml}$ ), Tetracain ( $0,5 \text{ mg/ml}$ ), Propipocain und Lidocain die Kininwirkung hemmen. Jedoch wird durch die genannten Lokalanästhetica das Meerschweinchenileum dosisabhängig für Bradykinin sensibilisiert, d. h. nach Auswaschen der Lokalanästhetica erfolgt eine Steigerung der Bradykininwirkung. Der Wirkungsmechanismus, vor allem in bezug auf die Unterschiede zwischen Hemmung, Potenzierung und Sensibilisierung konnte noch nicht aufgeklärt werden. Eine Wirkung auf Zellmembranen, unabhängig von der anästhetischen Wirkung, wird angenommen (37, 38).

#### *Substanzen mit Wirkung auf das autonome Nervensystem*

Nach ROCHA E SILVA und Mitarbeitern (39, 40) potenzieren oder hemmen in Abhängigkeit von der Konzentration die Sympathicolytica Phenoxybenamin<sup>1)</sup> Dibenamin<sup>1)</sup> und Chlorpromazin<sup>1)</sup>, ferner Guanethidin<sup>1)</sup> und Methdilazin<sup>1)</sup>, sowie Atropin und Reserpin die Kininwirkungen am isolierten Testorgan und am Blutdruck (41).

<sup>1)</sup> Nomenklatur nach H. IPPEN, Index Pharmacorum, Stuttgart 1968.



## Literatur

1. FREY, E. K., H. KRAUT, E. WERLE, R. VOGEL, G. ZICKGRAF-RÜDEL und I. TRAUTSCHOLD, Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Stuttgart (1968). — 2. ERDÖS, E. G., Adv. Pharmacol. 4, 1 (1966). — 3. EDERY, H., Brit. J. Pharmacol. 22, 371 (1964). — 4. EDERY, H. und Y. GRUNFELD, Brit. J. Pharmacol. 35, 51 (1969). — 5. EDERY, H., in E. G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri, Hypotensive Peptides, New York (1966). — 6. HAUSTEIN, K.-O. und F. MARKWARDT, Arch. internat. pharmacodyn. therap. 163, 393 (1966). — 7. EDERY, H., Symposium on Vasoactive Polypeptides, Sao Paulo (1966). — 8. ISO, T., H. IWATA und K. HANO, Yakugakuzasshi 88, 1523 (1968). — 9. EDERY, H., Brit. J. Pharmacol. 24, 485 (1965). — 10. GRAHAM, J. D. P. und H. AL KATIB, Brit. J. Pharmacol. 28, 1 (1966). — 11. EDERY, H., Nature, London 217, 70 (1968). — 12. ZACEST, R. und M. L. MASHFORD, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. 45, 89 (1967). — 13. ROCHA E SILVA, M., M. L. REIS und S. H. FERREIRA, Biochem. Pharmacol. 16, 1665 (1967). — 13a. KATORI, M., S. MINESHITA und T. SHIGEI, Pharmacol. Res. Commun. 1, 167 (1969). — 14. AARSEN, P. N., Brit. J. Pharmacol. 32, 453 (1968). — 15. HAMBERG, U., P. ELG und P. STELWAGEN, Adv. exper. Med. Biol. II, 626 (1968). — 16. DINIZ, C. R. und I. F. CARVALHO, Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 77 (1963). — 17. STEWART, J. M., Federation Proc. 27, 63 (1968). — 18. ZAORAL, M., persönliche Mitteilung in 17. — 19. TEWKSBURY, D. A. und M. A. STAHMANN, Arch. Biochem. Biophysics 112, 453 (1965). — 20. GLADNER, J. A., P. A. MURTAUGH, J. E. FOLK und K. LAKI, Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 47 (1963). — 21. GLADNER, J. A., in: E. G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri, Hypotensive Peptides, New York (1966). — 22. LAKI, K. und J. A. GLADNER, Physiol. Rev., Baltimore 44, 127 (1964). — 23. FABER, D. B., Acta physiol. pharmacol. Neerl. 15, 101 (1969). — 24. FABER, D. B., 4th Internation. Congress on Pharmacology, Basel 1969. — 25. FERREIRA, S. H., Brit. J. Pharmacol. 24, 163 (1965). — 26. FERREIRA, S. H., in E. G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri, Hypotensive Peptides, New York (1966). — 27. KATO, H. und T. SUZUKI, Pharmacol. Res. Commun. 1, 166 (1969). — 28. KATO, H. und T. SUZUKI, Experientia, Basel 25, 694 (1969). — 29. GREENE, L. J. und S. H. FERREIRA, 4th Internation. Congress on Pharmacology, Basel 1969. — 30. GREENE, L. J., J. M. STEWART und S. H. FERREIRA, Pharmacol. Res. Commun. 1, 159 (1969). — 31. FERREIRA, S. H. und M. ROCHA E SILVA, Experientia, Basel 21, 347 (1965). — 32. GRAEFF, F. G., S. H. FERREIRA, A. P. CORRADO und M. ROCHA E SILVA, Experientia, Basel 21, 607 (1965). — 33. STEWART, J. M., J. ROBLERO und J. W. RYAN, Pharmacol. Res. Commun. 1, 199 (1969). — 34. DOLESCHIEL, W. und W. AUERSWALD, Wien. med. Wschr. 116, 130 (1966). — 35. DOLESCHIEL, W. und W. AUERSWALD, Experientia, Basel 22, 540 (1966). — 36. LORENZ, W., G. FEIFEL, A. SCHMAL, M. HUTZEL und E. WERLE, Klin. Wschr. im Druck. — 37. WIEGERSHAUSEN, B. und H. DEPTALLA, Arch. internat. pharmacodyn. therap. 177, 278 (1969). — 38. WIEGERSHAUSEN, B., Pharmacol. Res. Commun. 1, 206 (1969). — 39. ROCHA E SILVA, M., A. P. CORRADO und A. O. RAMOS, J. Pharmacol. Exper. Therap., Baltimore 128, 217 (1960). — 40. ROCHA E SILVA, M. und J. GARCIA LEME, Med. exper. 8, 287 (1963). — 41. VOGEL, R., in Vorbereitung.

Dr. R. Vogel  
 Dr. G. Zickgraf-Rüdel  
 8000 München 15  
 Nußbaumstraße 20